

**PCT** WELTORGANISATION FÜR  
Internationale  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF



AK

WO 9605846A1

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 35/12, C07K 1/34</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/05846</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Februar 1996 (29.02.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE95/01094</b> (22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1995 (18.08.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 29 558.8          19. August 1994 (19.08.94)          DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SANORELL PHARMA GMBH & CO. [DE/DE]; Rechtungrasse 27, D-72270 Baiersbronn (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEBE, Carl, Thomas [DE/DE]; August-Frey-Weg 5, D-68526 Ladenburg (DE). (74) Anwalt: FRITZSCHE, Thomas; Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(54) Title: METHOD OF PRODUCING INFECTION-FREE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS AND/OR FOODSTUFFS FROM INFECTIOUS MATERIAL, PARTICULAR MATERIAL CONTAINING PRIONS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON INFEKTIONSFREIEN PHARMAZEUTISCHEN PRÄPARATEN UND/ODER NAHRUNGSMITTELEN AUS INFEKTIOSEM, INSBESONDERE PRIONEN ENTHALTENDEM, MATERIAL (57) Abstract Described is a method of producing non-infectious pharmaceutical preparations and/or foodstuffs from starting material which may be infected, in particular with prions. The starting material is freed from infections components merely by filtering it repeatedly through an ultra-filtration membrane and/or a series of ultra-filtration membranes. The method is particularly suitable for removing so-called slow viruses such as that causing spongiform encephalopathy. (57) Zusammenfassung Es wird ein Verfahren zur Herstellung von aus gegebenenfalls infektiösem, insbesondere Prionen enthaltendem Ausgangsmaterial gewonnenen infektionssicheren pharmazeutischen Präparaten und/oder Nahrungsmitteln beschrieben. Dabei wird das Ausgangsmaterial lediglich dadurch von infektiösen Bestandteilen befreit, daß man es wiederholt über eine Ultrafiltrationsmembran und/oder über eine Serie von Ultrafiltrationsmembranen filtriert. Das Verfahren ist besonders zum Entfernen von sog. langsamen Viren wie den Erregern der spongiformen Enzephalopathie geeignet.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Herstellung von infektionsfreien pharmazeutischen Präparaten und/oder Nahrungsmitteln aus infektiösem, insbesondere Prionen enthaltendem, Material

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von nicht-infektiösen pharmazeutischen Präparaten und/oder Lebensmitteln aus einem Ausgangsmaterial, das einen oder mehrere verschiedene Arten von infektiösen Erregern, insbesondere Prionen, enthält, bzw. bei dem nicht sicher ist, daß es frei von solchen Erregern ist.

Das wachsende Verständnis für den Stoffwechsel in Lebewesen hat dazu geführt, daß immer mehr Signal- und Transmittersubstanzen, wie beispielsweise Hormone, zur gezielten Steuerung und Beeinflussung von Körperfunktionen verwendet werden. Daher enthalten eine Vielzahl von pharmazeutischen Präparaten und Nahrungsergänzungsmitteln derartige Wirksubstanzen. Ein Großteil der hierfür eingesetzten Substanzen wird jedoch aus biologischen Quellen erhalten, d. h. durch Entnahme von Organen, Geweben oder Körperflüssigkeiten aus pflanzlichen, insbesondere jedoch aus tierischen oder gar menschlichen Spendern oder auch aus Zellkulturen davon.

Bei der Gewinnung von Substanzen aus lebenden Spendern besteht jedoch auch das Risiko, daß unwissentlich Material von Spendern verarbeitet wird, das mit einem oder sogar mit mehreren pathogenen Erregern infiziert bzw. verseucht ist. Dies stellt sowohl bei bekannten Erregern, wie beispielsweise dem Aids auslösenden HI-Virus, sowie beispielsweise bei den bislang unerkannten, beispielsweise den sogenannten Rinderwahnsinn (BSE) oder auch Scrapie auslösenden Erregern ein hohes Risiko bei der Herstellung solcher biologisch-therapeutischen Präparate dar. Biologisch-therapeutische Wirksubstanzen, wie beispielsweise das Immunsystem

- 2 -

aktivierende und regulierende Wirkstoffe. werden industriell aus der Thymusdrüse von Kälbern, das menschliche Wachstumshormon hGH wird aus der Hypophyse und Heparin wird zum Beispiel aus dem Darm von Schweinen oder der Lunge von Rindern gewonnen. Weitere Substanzen werden aus verschiedenen Plazentaextrakten erhalten. Bei Substanzen, die aus Zellkulturen gewonnen werden, besteht ebenfalls ein Risiko, daß diese Viren oder Virusarten oder virusähnliche Partikeln, sog. virus-like-particles, oder Prionen enthalten oder damit kontaminiert sind.

Es ist daher bereits auf vielfältige Weise versucht worden, derart gewonnene Präparate garantiert infektionsfrei herzustellen. Eine hierzu häufig verwendete Methode ist die Hitzesterilisation, die jedoch bei vielen biologischen Therapeutika auch zu einer teilweisen oder sogar zu einer vollständigen Inaktivierung des biologischen Wirkstoffes führt. Im Falle des Erregers der spongiformen Enzephalopathie hat es sich sogar gezeigt, daß selbst Temperaturen von 130 °C keine hinreichende Sicherheit zu seiner Inaktivierung bieten. Auch mittels chromatographischen Verfahren, wie beispielsweise mit der sogenannten Gelausschlußchromatographie oder auch mittels Affinitätschromatographie, ist versucht worden, die Menge der vorliegenden Erreger zu reduzieren oder diese sogar vollständig zu entfernen. Eine weitere Methode zur Entfernung von unerwünschten pathogenen Keimen ist das vorzugsweise fraktionierte Ausfällen mittels Ammoniumsulfat.

Das am einfachsten durchzuführende und daher auch am häufigsten verwendete Verfahren ist die Ultrafiltration mittels Membranen, wobei die Erreger aufgrund ihrer größeren Volumenmasse von der Filtrationsmembran zurückgehalten werden, wohingegen der kleinere gewünschte Wirkstoff die Membran passieren kann. Die Porengröße solcher Ultrafiltrationsmembranen ist jedoch nicht konstant, sondern weist ein durch

- 3 -

die Herstellung bedingte statistische Größenverteilung auf, so daß in jeder Membran zwangsläufig größere Poren vorliegen, durch die dann auch Bestandteile mit einem größeren Volumen bzw. Masse und damit auch Bakterien, Viren und Prionen bzw. sogenannte "langsame Viren" durch die Filtrationsmembran hindurchgelangen können, so daß regelmäßig im Filtrat noch eine u.U. infektiöse Menge des Erregers vorliegt.

Eine Titerreduktion von Erregern der spongiformen Enzephalopathie über 7 Zehnerpotenzen durch nur einen Verfahrensschritt ist bisher in der Literatur nur von Autoklavierungsvorgängen oder Alkalibehandlung her bekannt (Danner, K. (1991): Übertragung spongiformer Encephalopathien durch Arzneimittel, Pharm. Ind., 53, 614 - 623). Als maximal erreichbar gelten 8 Zehnerpotenzen durch 20 minütige Autoklavierung bei 133 °C oder einstündige Behandlung mit 1 N NaOH bei 20°C (Bundesgesundheitsamt: Bekanntmachung der Sicherheitsanforderungen an Arzneimittel aus Körperbestandteilen von Rind, Schaf und Ziege zur Vermeidung des Risikos einer Übertragung von BSE oder Scrapie vom 16. 2. 1994).

Alle zuvor genannten Verfahren haben gemeinsam, daß sie keine 100 %-ige Sicherheit dafür bieten, daß der potentiell vorliegende Erreger garantiert entfernt worden ist. Aus diesem Grunde schreiben die Arzneimittelzulassungsbehörden vor, daß bei der Herstellung von biologischen Therapeutika mehrere verschiedene der zuvor genannten Verfahren verwendet werden müssen, da mit nur einer Methode allein auch bei wiederholter Anwendung bislang keine 100 %-ige Inaktivierung des pathogenen Erregers sichergestellt war. Eine serielle Verwendung des gleichen Verfahrensschrittes wird daher von den Arzneimittelbehörden explizit als unerwünscht angesehen. Bei der "National Scientific Conference on Viral Safety and Evaluation of Viral Clearance from Biopharmaceutical Products" (Bethesda, Maryland, USA, 14. Juni 1995) lehnt

- 4 -

beispielsweise Dr. J. Löw r vom Paul Ehrlich Institut (Arzneimittelsicherheitsbehörde) beim Vortrag von Dr. S. Manabe es aus diesen Sicherheitsgründen ab, infektiöses Material allein durch Ultrafiltration beispielsweise an mit Phagen validierten Membranen zu entfernen.

Aus M. Pocchiari et al., Archives of Virology, 1988, Seite 131 sowie aus der EP-A-0 307 373 ist es beispielsweise bekannt, bei der Herstellung von menschlichem Wachstumshormon aus der Hypophyse des Menschen zur Reduzierung der Scrapieinfektivität über einen Filter mit einem Ausschlußvolumen von 100 kD oder über einen Filter mit einer Porengröße von 25 nm zu filtrieren, wobei in beiden Fällen eine Abnahme der Infektivität des Infektionstiters um einen Faktor von 2,2 bzw. 2,0 Zehnerpotenzen erreicht wird. Diese Abreicherungsrate läßt sich gemäß dem dort beschriebenen Verfahren dadurch erhöhen, daß der Lösung soviel Harnstoff zugesetzt wird, daß sie eine Konzentration von 6 M aufweist. Mit Hilfe dieses Additives konnte der Titer des infektiösen Agens von Scrapie sowie des Creutzfeldt-Jakob-Syndroms um einen Faktor von 4,4 bzw. 5,6 Zehnerpotenzen verringert werden. Um sicherzustellen, daß das Endprodukt keine infektiösen Erreger mehr aufweist, werden jedoch von den Arzneimittelsicherheitsbehörden wesentlich höhere Entfernungsraten verlangt. G. Stiles, "Unconventional Viruses", A unique challenge in the manufacturing of biotherapeutics, Proceedings of the workshop on biopharmaceutical process validation, February 20, 1992, Basel, Schweiz, Microbiological Associates Inc. Rockville, Maryland, U.S.A. beschreibt, daß es durch eine Mischung von verschiedenen Aufreinigungsverfahren, wie beispielsweise Membranfiltration mit 6 molarem Harnstoff, Ausfällen mit Ammoniumsulfat, chromatographische Auftrennung, und insbesondere auch durch eine Auswahl der Spendertiere, (Verdünnung des infektiösen

- 5 -

Materials), möglich ist, eine "Abreicherung" des Virus auf über 22 Zehnpotenzen zu erreichen.

Aus der WO 91/12027 ist ein Verfahren zur Bestimmung der Abreicherung von Viren in Lösungen und zur Bestimmung der Abreicherungsrate bekannt. Dabei wird das zu reinigende Material über eine Ultrafiltrationseinheit geleitet, deren Abreicherungsrate zuvor ermittelt wurde, indem der Filter oder die Filtrationseinheit mit Viren der Familie Leviviridae beaufschlagt und vor und nach der Filtration der Titer der Viren bestimmt und daraus die Abreicherungsrate ermittelt wurde.

Die Erfindung hat zum Ziel, ein Verfahren zur Herstellung von Biotherapeutika bzw. Lebensmitteln oder auch Additiven hierfür bereitzustellen, das auch im großtechnischen Maßstab einfach und bequem durchzuführen ist und das sicherstellt, daß bei der Verwendung der hiermit erhaltenen Produkte in pharmazeutischen Präparaten und/oder Nahrungsmitteln keine Infektion mehr auftreten kann, wenn dabei mit Prionen infiziertes oder sogar hochgradig infektiöses Ausgangsmaterial verwendet wird.

Dieses Ziel wird nun erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß man ein gegebenenfalls mit infektiösen Prionen verseuchtes Ausgangsmaterial dadurch von den infektiösen Bestandteilen gänzlich befreit oder zumindest soweit befreit, daß es nicht mehr infektiös ist, indem man es wiederholt über eine Ultrafiltrationsmembran filtriert. Obwohl dies nicht zu erwarten war, wurde nämlich entgegen dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis gefunden, daß bei einer wiederholten Filtration über die gleiche (oder auch eine andere) Membran die jeweilige Abreicherungsrate des infektiösen Agens ansteigt. Auf diese Weise ist es daher möglich, die Abreicherung des gegebenenfalls vorliegenden pathogenen Erregers durch ein mehrfache

- 6 -

Wiederholung der Ultrafiltration beschleunigt zu entfernen und man kann daher auf andere Verfahren verzichten, d. h. es ist erfindungsgemäß möglich, den oder die Erreger bzw. Prionen lediglich durch die wiederholte Anwendung der Filtration zu entfernen. Wie von anderen Filtrationen bekannt ist, wäre zu erwarten gewesen, daß große Partikel zunächst abgereichert werden und die kleineren Partikel in nachfolgenden Filtrationen in immer geringer werdenden Abreicherungsraten entfernt werden können. Gerade dies ist jedoch, wie erfindungsgemäß gefunden wurde, bei Prionen nicht der Fall. Vielmehr werden diese bei der zweiten und bei nachfolgenden Filtrationen in immer höheren Raten entfernt (s. Fig. 2). Die einzelne Abreicherung nimmt daher mit dem 2. Filtrationsschritt zu und nicht ab.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat sich als besonders geeignet für die Entfernung von sogenannten "langsamen Viren", also Prionen, erwiesen. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren zum Entfernen des Erregers der spongiformen Enzephalopathie, insbesondere von Scrapie, Rinderwahnsinn (BSE), Jakob-Creutzfeldt, Kuru, Gerstmann-Sträussler und Alzheimer, verwendet.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß gleichzeitig andere infektiöse Materialien wie Viren und Bakterien, sowie Endotoxin ebenfalls entfernt werden, was z. B. bei anderen Inaktivierungsverfahren nicht immer der Fall ist.

Bevorzugte Organe für die Gewinnung von Ausgangsmaterial sind Thymus, insbesondere Kalbsthymus, die Hypophyse von Tieren und Menschen, tierische und menschliche Plazenta sowie die Intestinalorgane vom Schwein und von Wiederkäuern, wie Rind, Ziege und Schaf. Auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, sind bevorzugt. Auch Biomoleküle aus Zellkulturen, wie z. B.



- 7 -

Interleukin-2 aus stimulierten menschlichen Lymphozyten, Gewebs-Plasminogen-Aktivator (t-PA) aus Säugetierzellkultur oder rekombinante Glykoproteine sind nämlich ebenfalls potentiell mit pathogenen Erregern kontaminiert. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch besonders für die Gewinnung von Substanzen und Präparaten aus transgenen Tieren oder aus transgenen Zellkulturen geeignet, da diese häufig Zoonosen aufweisen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren werden vorzugsweise Ultrafiltrationsmembranen verwendet, die einen Porendurchmesser von kleiner 100 nm, vorzugsweise von 50 - 0,5 nm, 30 - 1 nm aufweisen, wobei 10 - 1 nm bevorzugt sind. Bevorzugte durchschnittliche Porengrößen lassen Moleküle mit einem Molekulargewicht von 30 kD die Membran nicht mehr passieren. Besonders bevorzugt sind Spiralmembranen und insbesondere Membranen mit Tangentialfluß, wie sie beispielsweise unter der Bezeichnung Amicon Spiralmembranen, z. B. S1Y30, S10Y30 und S100Y30, im Handel erhältlich sind. Besonders geeignet sind hydrophile Membranen, insbesondere mit geringen Adsorptionseigenschaften, wie Membranen aus regenerierter Cellulose, aus Polysulfon bzw. Gemischen davon.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die im erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendende Ultrafiltrationsmembran vor ihrer Verwendung mit dem zu filtrierenden Ausgangsmaterial vorzubehandeln. Dazu wird über die hydrierte, vorgewässerte und zweckmäßigerweise mit einer physiologischen Kochsalzlösung getränkte Membran ein garantiert erregerfreies Ausgangsmaterial filtriert.

Es hat sich gezeigt, daß sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren allein mit der zweiten Ultrafiltration der Erreger um mindestens einen Faktor von  $10^{-6}$ , insbesondere um mindestens  $10^{-7}$ , abreichern läßt. Zweckmäßigerweise wird das zu

- 8 -

reinigendes Material so oft über eine Ultrafiltrationsmembran filtriert, bis sich im Filtrat keine Infektiosität mehr nachweisen läßt. Dies ist nach mindestens zweifacher, vorzugsweise drei- oder mehrfacher Ultrafiltration der Fall.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat sich als besonders geeignet erwiesen, wenn das zu reinigende Material über einen Ultrafilter oder eine Ultrafiltrationseinheit geleitet wird, deren Abreicherungsrate zuvor ermittelt wurde, wie dies in der WO 91/12027 beschrieben ist. Dabei wird der Filter oder die Filtrationseinheit mit Viren der Familie Leviviridae beaufschlagt und vor und nach der Filtration der Titer der Viren bestimmt. Aus der Differenz der Viruskonzentration wird dann die Abreicherungsrate ermittelt. Bevorzugte, hierfür verwendbare Testviren sind die Leviviridae-Viren MS2, F2 oder R17. Als besonders zweckmäßig hat sich jedoch der Bakteriophage φ mit der Hinterlegungsnummer ATCC Nr. 15767-B1 erwiesen, wie dies in der zuvor genannten WO 91/12027 näher beschrieben ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren mittels eines Druckhaltetestes kontrolliert wie es in der WO 93/02714 beschrieben ist.

Bevorzugte mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Produkte sind die das Immunsystem stimulierenden bzw. regulierenden Substanzen des Thymus, sowie Heparin und menschliches Wachstumshormon, sowie über Säugerzellkulturen gewonnene natürliche oder rekombinante Moleküle.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele näher erläutert werden.

### Beispiel 1

Vollständige Entfernung von Scrapie-Erregern  
Modellhaft für sog. langsame Viren bzw. Prionen wurde Scrapie-Erreger in einem Hamsterstamm vermehrt und nach Beaufschlagen auf einer produktionstypischen Ultrafiltrationsanlage von 5 seriellen Patronen abgereichert und die Infektiosität der Ultrafiltrate im Tierversuch ermittelt (siehe Fig. 1).

#### 1.1 Gewinnung von infektiösen Scrapie-Erregern

Ein mit dem Scrapiestamm 263K infiziertes Gehirn eines Hamsters im Terminalstadium wurde maceriert und gepoolt. Davon wurden 500 mg in 4,5 ml einer sterilen physiologischen Salzlösung gegeben, homogenisiert und 10 Minuten lang bei 500 g zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden intracerebral in 40 syrische LVG-Hamster injiziert. Die Tiere wurden bei Auftreten der Erkrankung mittels Genickbruch getötet, sobald dies aufgrund ihres klinischen Zustands notwendig war. Dies war üblicherweise 65 bis 80 Tage nach der Injektion der Fall. Die Gehirne wurden aseptisch entnommen, gefroren, maceriert, mit einer sterilen Kochsalzlösung versetzt und homogenisiert. Danach wurde 10 Minuten lang bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand als "Spike"-Material verwendet.

#### 1.2 Gewinnung von Thymusdrüsen-Homogenisat

Es wurden drei Thymusdrüsen von Kälbern püriert (ca. 550 g) und mit 1,5 l pyrogenfreiem Wasser versetzt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

- 10 -

Die Vorfilter und Ultrafilter wurden wie üblich mit Wasser gewaschen. Für die Vorfiltration wurde Thymusextrakt hintereinander über Nylongaze und drei Mikrofiltrationsmembranen (Pall, Nylonmembranen) mit Porengrößen von 2,0 µm, 0,8 µm und 0,2 µm filtriert. Um sicherzustellen, daß die Entfernung des Erregers nicht durch eine Absorption der Partikel an der großen inneren Oberfläche der spiralgewickelten Patronen verfälscht wird und um möglichst die alleinige Filtrationsabreicherung zu erfassen, wurden die für die Virusabreicherung einzusetzenden Filter vorbeschichtet. Dazu wurden sowohl die Vorfilter als auch die Filter wurden mit dem gewonnenen Thymushomogenisat vorbehandelt, d. h., es wurde jeweils eine geringe Menge (4 x 200 ml) über den Filter gegeben.

### 1.3 Entfernung der Scrapie-Erreger

10 ml der in Beispiel 1 gewonnenen Scrapie-Spike-Lösung wurde 600 ml des Thymushomogenisats zugesetzt und bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Dann wurde die Lösung über einen ersten Vorfilter mit einer Porengröße von 2,0 µm, einen zweiten Vorfilter mit einer Porengröße von 0,8 µm und einen dritten Vorfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Das so erhaltene Filtrat wurde als Probe A bezeichnet.

190 ml des gespikten Vorfiltrat-Materials wurden nochmals mit 6 ml der Scrapie-Spike-Lösung beaufschlagt und dann einer Ultrafiltration über eine Amiconmembran S1Y30 unterworfen. Das so erhaltene Filtrat wurde als Probe B bezeichnet.

144 ml von Probe B wurden nochmals mit 6 ml des Scrapie-Spike-Materials beaufschlagt und einer zweiten Ultrafiltration über eine weitere Amicon S1Y30-Membran unterworfen. Das hierdurch erhaltene Filtrat wurde als Probe C bezeichnet.

- 11 -

121 ml der Probe C wurde nochmals mit 6 ml des Scrapie-Spike-Materials versetzt und nochmals wie zuvor einer Ultrafiltration über die gleiche Membran unterworfen. Die hierbei erhaltene Lösung wird als Probe D erhalten.

121 ml der Probe D wurden einer vierten Ultrafiltration über die gleiche Membran unterworfen. Die hierbei erhaltene Lösung wurde als Probe E bezeichnet.

93 ml der Probe E wurden einer fünften Ultrafiltration mit der gleichen Membran unterworfen. Das hierbei erhaltene Filtrat wird als Probe F bezeichnet.

Die Probe F wurde anschließend nochmals durch eine Sterilfiltration über einen Filter von 0,2 µm geleitet. Das hierbei erhaltene Filtrat wird als Probe G bezeichnet.

Zum Überblick über das verwendete Abreicherungsverfahren wird auf Fig. 1 verwiesen.

#### 1.4 Titration des infektiösen Erregers am Hamstermodell

Jeweils 12 Hamstern wurden 50 µl der unverdünnten bzw. logarithmisch verdünnten Proben A, B, C, D und G intracerebral injiziert. Für die Proben E und F wurden jeweils 24 Hamster mit nur 50 µl der unverdünnten Lösung intracerebral infiziert. Zur Bestimmung der Infektiosität des Scrapieagens wurden insgesamt 96 Hamstern mit 50 µl des Spike-Materials mit verschiedenen Verdünnungen behandelt, wobei für jede Verdünnung 12 Hamster infiziert wurden.

50 Tage nach Injektion wurde der Zustand der Tiere bezüglich klinischen neurologischen Symptomen beobachtet, und alle befallenen Tiere wurden in dem Terminalstadium der Erkrankung getötet und analysiert. Tiere, die keine Symptome zeigten,

- 12 -

wurden nach Beendigung der Studie, d.h. ca. 450 Tage nach Injektion ebenfalls getötet und untersucht.

- Titration des Scrapie-Spike-Materials (positive Kontrolle)  
Nach Beendigung der Studie zeigten alle Hamster, die mit dem unverdünnten Spike-Material sowie mit Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  infiziert worden waren, eine histopathologisch bestätigte Scrapie-Infektion. Bei den Verdünnungen von  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  zeigten 7 von 12 Hamstern eine Infektion, die ebenfalls durch histopathologische Untersuchungen bestätigt wurde. Keiner der Hamster, die mit der  $10^{-8}$  verdünnten Lösung infiziert worden ist, zeigte irgendwelche klinischen oder histopathologischen Symptome der Scrapie-Erkrankung.

#### Probe A (nach Vorfiltration)

Hamster, die mit der unverdünnten Probe A und mit Verdünnungen bis zu  $10^{-5}$  infiziert wurden, zeigten das Auftreten von Scrapie. Bei keinem der Hamster, die mit den  $10^{-6}$ - und  $10^{-7}$ -fachen Verdünnungen infiziert wurden, konnte der Ausbruch der Erkrankung beobachtet werden.

#### Probe B (Produkte der ersten Ultrafiltration)

Hier wurden nur noch nach Injektion mit der unverdünnten sowie mit den  $10^{-1}$ - und  $10^{-2}$ -fachen Verdünnungen das Auftreten von Scrapie-Infektionen beobachtet. Bei weiteren Verdünnungen konnte kein Auftreten der Erkrankung mehr beobachtet werden.

#### Proben C bis G

Nach Beenden der Studie wurden mit diesen Produkten kein Auftreten einer Scrapie-Infektion in den Proben C, E, F und G gefunden. Lediglich 2 Hamster, die mit der unverdünnten Probe D infiziert wurden, entwickelten klinische Anzeichen einer Scrapie-Infektion. In diesem Zusammenhang wird nochmal darauf

- 13 -

hing wiesen, daß die Probe D nach dem Respiking des Filtrates mit Scraipi -Homogenisat rhalt n wurd .

Die Ergebnisse der Hamster-Inokulation und die Ergebnisse der Histopathologie und des Infektionstiters (LD50/ml) sind in Tabelle 1 angegeben. Dabei wurde der Infektionstiter unter Verwendung der Methode von Karber (1931, Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reinversuche; Archives of experimental pathology and pharmacology, 162, 480 - 483) wie folgt bestimmt:

$$m = X + 1/2 d - d \frac{(\sum r_l)}{(n)}$$

wobei

- m der durchschnittliche LD50-Wert pro Inokulationsvolumen bedeutet,
- X der Reziprokwert der höchsten infektiösen Verdünnung bedeutet,
- d der Logarithmus des Verdünnungsintervalls,
- r<sub>l</sub> die Anzahl der bei jeder Verdünnung nicht infizierten Tiere und
- n die Anzahl der mit jeder Verdünnung inokulierten Tiere bedeutet.

Auf diese Weise ergab sich für das Ausgangsmaterial ein Infektionstiter von  $10^{5.45}$  LD50/ml. Nach drei Vorfiltrationen für die Probe A  $10^{4.97}$  LD50/ml betrug die Gesamtzahl der infektiösen Erreger vor der ersten Ultrafiltration somit nach dem Respiken ( $6 \text{ ml} \times 10^{5.45}$ )  $10^{5.23}$  LD50-Einheiten (150 ml). Nach Ultrafiltration enthielt die Probe B nur noch  $10^{4.86}$  LD50-Einheiten ( $10^{2.88}$  LD50/ml). Dies ergibt eine

- 14 -

Abreichung des Erregers bei der ersten Ultrafiltration um den Faktor  $10^{4,67}$ .

#### Abreicherung bei der zweiten Ultrafiltration

Nach dem Respiken der Probe ( $6 \text{ ml} \times 10^{8,45}$ ) enthielt die Lösung (127 ml) insgesamt  $10^{9,22}$  LD50 Erreger. Der trotz erneuter Beaufschlagung gefundenen Infektionstiter nach der zweiten Ultrafiltration war kleiner als 1 LD50/ml, d. h. es wurde kein Erreger mehr gefunden. Dies ergibt einen Titer in 127 ml von  $< 10^2$  LD50. Damit ist die Abreicherung im zweiten Ultrafiltrationsschritt größer als  $10^{7,13}$ .

Wie zuvor beschrieben wurde die Probe G bestimmt. Hier wurde eine Abreicherung um einen Faktor von  $> 10^{7,28}$  gefunden.

Fig. 2 zeigt die Abreicherungsraten des Scrapie-Erregers durch serielle Ultrafiltration. Entgegen dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis einer konstanten oder sogar abnehmenden Abreicherung, wie sie etwa bei der seriellen Filtration des Bakteriophagen fr über die gleiche Ultrafiltrationsmembran SLY30 beobachtet wird (WO 91/12027, Tabelle 3), nimmt die Abreicherungsrate für den Scrapie-Erreger nach dem ersten Filtrationsschritt mehr als 2 Zehnerpotenzen zu.

Durch die serielle Ultrafiltration kann somit selbst die Titerreduktion durch die als sicher geltenden Autoklavier- oder Alkalibehandlung um ein Erhebliches unterschritten und damit ein Arzneimittel ohne Gefährdungspotential durch Erreger der spongiformen Enzephalopathien hergestellt werden. Unabhängig davon können natürlich zusätzliche Vor- oder Nachreinigungsschritte mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kombiniert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß die Erreger durch



- 15 -

Ultrafiltration entfernt werden, bis das Produkt mit Sicherheit nicht mehr infektiös wirkt.

Die vorliegenden Versuche belegen, daß mit einer wiederholten Ultrafiltration die Entfernung von infektiösen Erregern, wie Prionen bzw. sogenannten "langsamen Viren" die Abreicherungsgeschwindigkeit pro Filtrationsschritt um mindestens das 100- bis 1000-fache ansteigt, was zu einer rapiden Beschleunigung der Entfernung des Erregers und damit auch zu einer Infektionssicherheit des so erhaltenen Produktes führt.

TABELLE 1  
Entfernen eines Rodent Adaptierten Scrapie Agens

Probe	Log. Verdünnung	behandelte Tiere	zwischenzeitlich aufgetretene Todesfälle <sup>1</sup>	Tiere mit Scrapie <sup>2</sup>	durchschnittliche Inkubationsdauer (SE) <sup>3</sup>	Titer der Infektivität (LD 50/ml) <sup>4</sup>
A	unverdünn	12	0	12	93.17 (3.71)	10 <sup>4.7</sup>
	10 <sup>-1</sup>	12	0	12	120.75 (13.90)	
	10 <sup>-2</sup>	12	0	12	105.58 (2.01)	
	10 <sup>-3</sup>	12	0	8	132.13 (15.28)	
	10 <sup>-4</sup>	12	0	5	197.40 (42.37)	
	10 <sup>-5</sup>	12	1	1	112.00	
	10 <sup>-6</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-7</sup>	12	0	0	-	
B	unverdünn	12	1	11 <sup>5</sup>	124.09 (13.22)	10 <sup>3.8</sup>
	10 <sup>-1</sup>	12	1	5	168.00 (20.65)	
	10 <sup>-2</sup>	12	0	2	126.00 (0.00)	
	10 <sup>-3</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-4</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-5</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-6</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-7</sup>	12	1	0	-	

TABELLE 1 - Fortsetzung  
Entfernen eines Rodent Adaptierten Scrapie Agens

Probe	Log. Verdünnung	behandelte Tiere	zwischenzeitlich aufgetretene Todesfälle <sup>1</sup>	Tiere mit Scrapie <sup>2</sup>	durchschnittliche Inkubationsdauer (SE) <sup>3</sup>	Titer der Infektivität (LD 50/ml) <sup>4</sup>
C	unverdünn	12	1	0	-	0
	10 <sup>-1</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-2</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-3</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-4</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-5</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-6</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-7</sup>	12	0	0	-	
D	unverdünn	12	0	2	146.00 (14.00)	≤ 10 <sup>3.00</sup> (s. Fußnote 7)
	10 <sup>-1</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-2</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-3</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-4</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-5</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-6</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-7</sup>	12	1	0	-	

TABELLE 1 - Fortsetzung  
Entfernen eines Rodent Adaptierten Scrapie Agens

Probe	Log. Verdünnung	behandelte Tiere	zwischenzeitlich aufgetretene Todesfälle	Tiere mit Scrapie	durchschnittliche Inkubationsdauer (SE) <sup>3</sup>	Titer der Infektivität (LD 50/ml) <sup>4</sup>
E	unverändert	12	0	0	-	0
F	unverändert	12	1	0	-	0
G	unverändert	12	0	0	-	0
	10 <sup>-1</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-2</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-3</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-4</sup>	12	1	0	-	
	10 <sup>-5</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-6</sup>	12	0	0	-	
	10 <sup>-7</sup>	12	0	0	-	

ERSATZBLATT

TABELLE 1 - Fortsetzung  
Entfernen eines Rodent Adaptierten Scrapie Agens

Probe	Log. Verdünnung	behandelte Tiere	zwischenzeitlich aufgetretene Todesfälle <sup>4</sup>	Tiere mit Scrapie <sup>2</sup>	durchschnittliche Inkubationsdauer (SE) <sup>3</sup>	Titer der Infektivität (LD 50/ml) <sup>1</sup>
SPIKE MATERIAL <sup>5</sup>	10 <sup>-1</sup>	12	0	12	73.00 (1.77)	10 <sup>4-8</sup>
	10 <sup>-2</sup>	12	0	12	75.42 (1.48)	
	10 <sup>-3</sup>	12	0	12	84.75 (1.91)	
	10 <sup>-4</sup>	12	0	12	91.00 (0.86)	
	10 <sup>-5</sup>	12	0	12	105.00 (3.11)	
	10 <sup>-6</sup>	12	0	7	153.00 (32.02)	
	10 <sup>-7</sup>	12	0	7	152.29 (23.60)	
	10 <sup>-8</sup>	12	1	0	-	

<sup>1</sup> Todesfälle, die nicht mit dem Auftreten von Scrapie vor dem 343. Tag erfolgten - durch Histologie bestätigt

<sup>2</sup> Durch Histologie bestätigt

<sup>3</sup> (SE) = Standardabweichung

<sup>4</sup> Titer der Infektivität, berechnet nach Karber

<sup>5</sup> Beaufschlagung mit 30 g Gew./Vol. Homogenisat, die 1:3 verdünnt war

<sup>6</sup> Korrigiert für die 1:3 Verdünnung des ursprünglichen 30 g Gew./Vol. Homogenisats

<sup>7</sup> Aufgrund der niedrigen Anzahl bei einer Verdünnung infizierten Tiere wurde zur Berechnung des Titers eine Modifikation von Karber verwendet

<sup>8</sup> Diese Gruppe wurde bei der Berechnung des Titers nach der Methode von Karber nicht verwendet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten und/oder Nahrungsmitteln aus möglicherweise mit Prionen verseuchtem Ausgangsmaterial, umfassend die sichere Entfernung der infektiösen Erreger, dadurch gekennzeichnet, daß die Prionen lediglich dadurch entfernt werden, daß man das zu reinigende Material wiederholt über eine Ultrafiltrationsmembran und/oder über eine Serie von Ultrafiltrationsmembranen filtriert.
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das infektiöse Material ein Erreger der spongiformen Enzephalopathie ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Erreger Scrapie, BSE, Kuru, Gerstmann-Sträussler, Jakob-Creutzfeldt und/oder Alzheimer verursacht.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Filtrationsmembran vor ihrer Verwendung mit dem zu filtrierenden Ausgangsmaterial vorbehandelt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ab der zweiten Ultrafiltration den Erreger um mindestens einen Faktor von  $10^{-6}$ , vorzugsweise mindestens  $10^{-7}$ , abreichert.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Präparat Thymusfraktionen, Heparin, natürliche und/oder rekombinante Proteine aus Zellkulturen und/oder humanen menschlichen Wachstumsfaktor enthält.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Präparat Interleukin-2, rekombinantes Glykoprotein und/oder Gewebs-Plasminogen-Aktivator umfaßt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ultrafiltrationsmembran eine Amicon Spiralmembran mit Tangentialfluß S1Y30, S10Y30 oder S100Y30 verwendet.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Ultrafiltrationsmembran durch Beaufschlagen mit Viren der Familie Leviviridae validiert.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mittels einem Druckhaltetest kontrolliert wird.

\*\*\*

# Abreicherung des Scrapie-Erregers durch Ultrafiltration

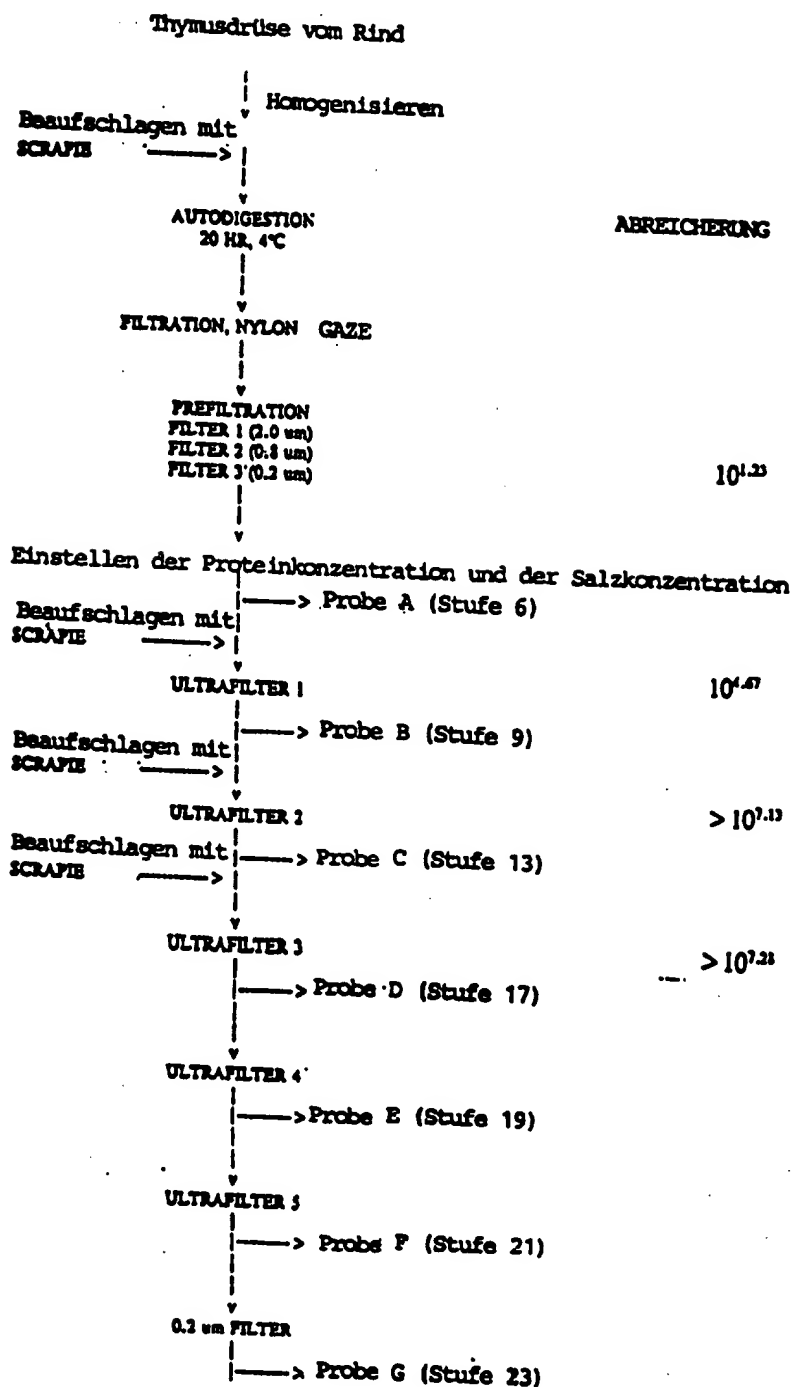
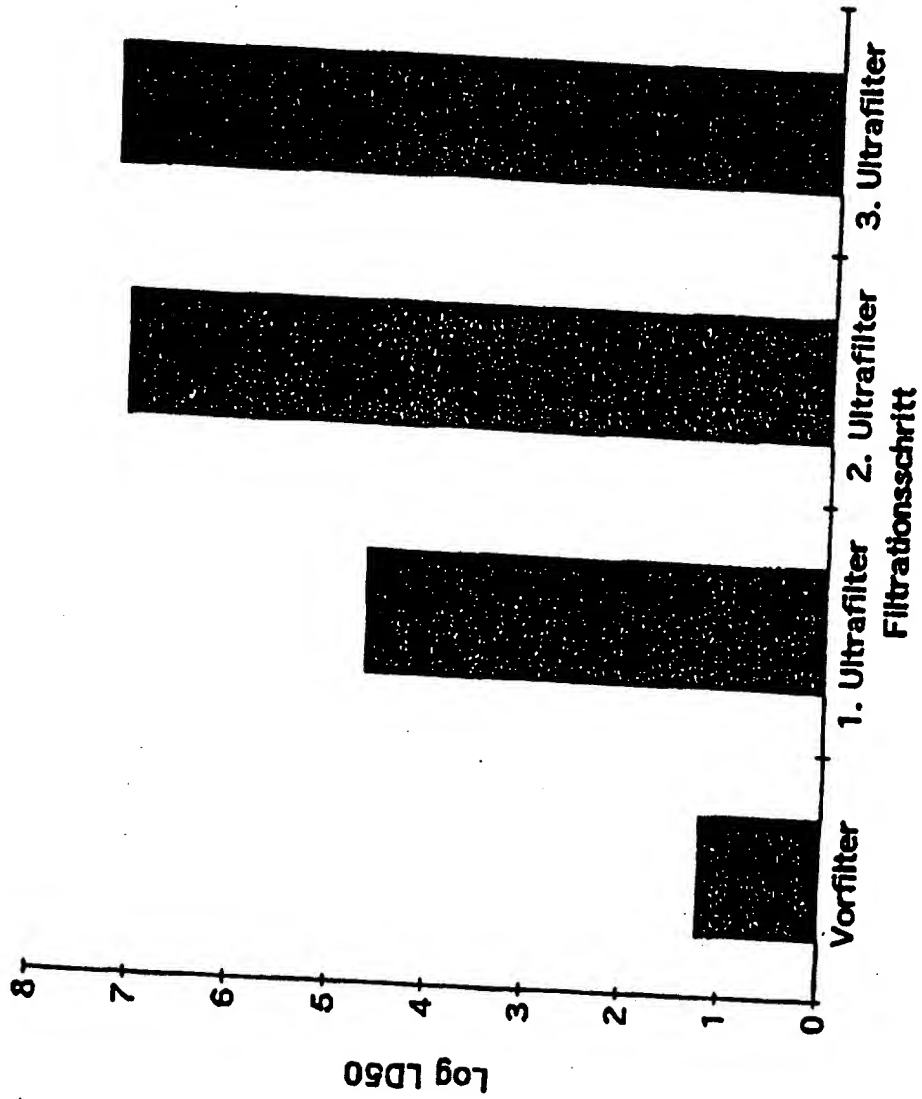


FIG. 1



FIG. 2 Abreicherung des Erregers von Scrapie durch mehrfache Ultrafiltration



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N.  
PCT/DE 95/01094

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> : A 61 K 35/12, C 07 K 1/34

According to International Patent Classification (IPC) r to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> : A 61 K, C 07 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used).

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE, A, 3 219 248 (SOLCO BASEL AG) 24 November 1983 (24.11.83), claims 1-3	1 - 5
A	WO, A, 83/00 044 (AMERICAN NATIONAL RED. CROSS) 17 February 1983 (17.02.83), claims 1-5, 13, 14.	1 - 5
A	WO, A, 82/03 568 (BIOMEDICAL ENGINEERING, INC.) 28 October 1982 (28.10.82), claims 1, 2, 8.	1 - 5
A	EP, A, 0 033 686 (INSTITUT NATIONAL DE LA	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>
---	--	---

Date of the actual completion of the international search  
20 November 1995

Date of mailing of the international search report  
14.12.95

Name and mailing address of the ISA/  
Eur pean Patent Office  
Facsimile No.

Authorized officer  
Telephone N.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/DE 95/01094****C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p data-bbox="527 321 912 420">RECHERCHE AGRONOMIQUE) 12 August 1981 (12.08.81), claims 1,2.</p>	

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

A 61 K 35/12, C 07 K 1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK 6

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A 61 K, C 07 K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE, A, 3 219 248 (SOLCO BASEL AG) 24 November 1983 (24.11.83), Ansprüche 1-3. --	1-5
A	WO, A, 83/00 044 (AMERICAN NATIONAL RED. CROSS) 17 Februar 1983 (17.02.83), Ansprüche 1-5, 13, 14. --	1-5
A	WO, A, 82/03 568 (BIOMEDICAL ENGINEERING, INC.) 28 Oktober 1982 (28.10.82), Ansprüche 1, 2, 8. --	1-5
A	EP, A, 0 033 686 (INSTITUT NATIONAL DE LA	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*A\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  
20 November 1995

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

14.12.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

BRUS e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	RECHERCHE AGRONOMIQUE) 12 August 1981 (12.08.81), Ansprüche 1,2. -----	

## ANHANG

zu internationalen Recherchen-  
bericht über die internationale  
Anmeldung Nr.

## ANNEX

to the International Search  
Report to the International Patent  
Application No.

## ANNEXE

au rapport de recherche inter-  
national relatif à la demande de brevet  
international n°

PCT/DE 95/01094 SAE 116157

In diesem Anhang sind die Mitglieder  
der Patentfamilien der im obenge-  
nannten internationalen Recherchenbericht  
geführten Patentdokumente angegeben.  
Diese Angaben dienen nur zur Unter-  
stützung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family  
members relating to the patent documents  
cited in the above-mentioned inter-  
national search report. The Office is  
in no way liable for these particulars  
which are given merely for the purpose  
of information.

La présente annexe indique les  
membres de la famille de brevets  
relatifs aux documents de brevets cités  
dans le rapport de recherche inter-  
national visé ci-dessus. Les renseigne-  
ments fournis sont donnés à titre indica-  
tif et n'engagent pas la responsabilité  
de l'Office.

In Recherchenbericht geführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
DE A1 3219248	24-11-83	AT E 192249 AT A 1839783 AT B 491807 BE A1 896807 CH A 3663539 DE A5 3663539 DE CO 3663539 DE A2 951170 DE A3 951170 DE A4 951170 DE B1 951170 DE B2 951170 FR A1 3237079 FR B1 3237079 GB A0 3237079 GB A1 3237079 GB B2 3237079 HU B 1906432 JP A2 58210021 JP B4 1007970 JP A1 242091 JP B1 139882 US A 4599176 YU A 1123783 YU B 43309	15-05-86 15-06-86 10-12-80 16-09-86 21-12-86 21-12-86 21-12-86 20-11-86 20-05-86 06-06-86 16-04-86 05-02-86 11-11-86 11-04-86 11-04-86 07-12-86 10-02-86 30-07-84 31-04-87 08-07-86 28-02-86 30-06-89
JD A1 8300044	06-01-83	AU A1 85096782 AU B2 5339797 DE A1 5316632 EP A1 684407 FR A1 3237079 GB A0 3237079 JP A2 58210021 NL A 8220204 US A0 8220204 US A 8220204 US A1 8220204 US A1 8220204 US A1 8220204 US A2 57212154	06-01-83 18-10-86 10-11-86 05-01-86 10-11-86 08-06-86 12-11-86 12-11-86 02-05-86 03-06-86 03-06-86 03-06-86 03-06-86 03-06-86 27-12-86
JD A1 8203568	28-10-82	DE T 3241315 EP A1 3241315 JP A1 3241315 JP T2 58500983	24-01-86 16-04-86 15-06-86 24-06-86
EP A1 33686		AT E 10330 AU A1 66782781 AU B2 548657 CA A1 1165711 DE CO 31672245 DK A 4377881 EP A2 4377881 EP A3 4377881 EP B1 4377881 EP A4 4377881 EP A5 4377881 EP A6 4377881 EP A7 4377881 EP A8 4377881 EP A9 4377881 EP A10 4377881 EP A11 4377881 EP A12 4377881 EP A13 4377881 EP A14 4377881 EP A15 4377881 EP A16 4377881 EP A17 4377881 EP A18 4377881 EP A19 4377881 EP A20 4377881 EP A21 4377881 EP A22 4377881 EP A23 4377881 EP A24 4377881 EP A25 4377881 EP A26 4377881 EP A27 4377881 EP A28 4377881 EP A29 4377881 EP A30 4377881 EP A31 4377881 EP A32 4377881 EP A33 4377881 EP A34 4377881 EP A35 4377881 EP A36 4377881 EP A37 4377881 EP A38 4377881 EP A39 4377881 EP A40 4377881 EP A41 4377881 EP A42 4377881 EP A43 4377881 EP A44 4377881 EP A45 4377881 EP A46 4377881 EP A47 4377881 EP A48 4377881 EP A49 4377881 EP A50 4377881 EP A51 4377881 EP A52 4377881 EP A53 4377881 EP A54 4377881 EP A55 4377881 EP A56 4377881 EP A57 4377881 EP A58 4377881 EP A59 4377881 EP A60 4377881 EP A61 4377881 EP A62 4377881 EP A63 4377881 EP A64 4377881 EP A65 4377881 EP A66 4377881 EP A67 4377881 EP A68 4377881 EP A69 4377881 EP A70 4377881 EP A71 4377881 EP A72 4377881 EP A73 4377881 EP A74 4377881 EP A75 4377881 EP A76 4377881 EP A77 4377881 EP A78 4377881 EP A79 4377881 EP A80 4377881 EP A81 4377881 EP A82 4377881 EP A83 4377881 EP A84 4377881 EP A85 4377881 EP A86 4377881 EP A87 4377881 EP A88 4377881 EP A89 4377881 EP A90 4377881 EP A91 4377881 EP A92 4377881 EP A93 4377881 EP A94 4377881 EP A95 4377881 EP A96 4377881 EP A97 4377881 EP A98 4377881 EP A99 4377881 EP A100 4377881 EP A101 4377881 EP A102 4377881 EP A103 4377881 EP A104 4377881 EP A105 4377881 EP A106 4377881 EP A107 4377881 EP A108 4377881 EP A109 4377881 EP A110 4377881 EP A111 4377881 EP A112 4377881 EP A113 4377881 EP A114 4377881 EP A115 4377881 EP A116 4377881 EP A117 4377881 EP A118 4377881 EP A119 4377881 EP A120 4377881 EP A121 4377881 EP A122 4377881 EP A123 4377881 EP A124 4377881 EP A125 4377881 EP A126 4377881 EP A127 4377881 EP A128 4377881 EP A129 4377881 EP A130 4377881 EP A131 4377881 EP A132 4377881 EP A133 4377881 EP A134 4377881 EP A135 4377881 EP A136 4377881 EP A137 4377881 EP A138 4377881 EP A139 4377881 EP A140 4377881 EP A141 4377881 EP A142 4377881 EP A143 4377881 EP A144 4377881 EP A145 4377881 EP A146 4377881 EP A147 4377881 EP A148 4377881 EP A149 4377881 EP A150 4377881 EP A151 4377881 EP A152 4377881 EP A153 4377881 EP A154 4377881 EP A155 4377881 EP A156 4377881 EP A157 4377881 EP A158 4377881 EP A159 4377881 EP A160 4377881 EP A161 4377881 EP A162 4377881 EP A163 4377881 EP A164 4377881 EP A165 4377881 EP A166 4377881 EP A167 4377881 EP A168 4377881 EP A169 4377881 EP A170 4377881 EP A171 4377881 EP A172 4377881 EP A173 4377881 EP A174 4377881 EP A175 4377881 EP A176 4377881 EP A177 4377881 EP A178 4377881 EP A179 4377881 EP A180 4377881 EP A181 4377881 EP A182 4377881 EP A183 4377881 EP A184 4377881 EP A185 4377881 EP A186 4377881 EP A187 4377881 EP A188 4377881 EP A189 4377881 EP A190 4377881 EP A191 4377881 EP A192 4377881 EP A193 4377881 EP A194 4377881 EP A195 4377881 EP A196 4377881 EP A197 4377881 EP A198 4377881 EP A199 4377881 EP A200 4377881 EP A201 4377881 EP A202 4377881 EP A203 4377881 EP A204 4377881 EP A205 4377881 EP A206 4377881 EP A207 4377881 EP A208 4377881 EP A209 4377881 EP A210 4377881 EP A211 4377881 EP A212 4377881 EP A213 4377881 EP A214 4377881 EP A215 4377881 EP A216 4377881 EP A217 4377881 EP A218 4377881 EP A219 4377881 EP A220 4377881 EP A221 4377881 EP A222 4377881 EP A223 4377881 EP A224 4377881 EP A225 4377881 EP A226 4377881 EP A227 4377881 EP A228 4377881 EP A229 4377881 EP A230 4377881 EP A231 4377881 EP A232 4377881 EP A233 4377881 EP A234 4377881 EP A235 4377881 EP A236 4377881 EP A237 4377881 EP A238 4377881 EP A239 4377881 EP A240 4377881 EP A241 4377881 EP A242 4377881 EP A243 4377881 EP A244 4377881 EP A245 4377881 EP A246 4377881 EP A247 4377881 EP A248 4377881 EP A249 4377881 EP A250 4377881 EP A251 4377881 EP A252 4377881 EP A253 4377881 EP A254 4377881 EP A255 4377881 EP A256 4377881 EP A257 4377881 EP A258 4377881 EP A259 4377881 EP A260 4377881 EP A261 4377881 EP A262 4377881 EP A263 4377881 EP A264 4377881 EP A265 4377881 EP A266 4377881 EP A267 4377881 EP A268 4377881 EP A269 4377881 EP A270 4377881 EP A271 4377881 EP A272 4377881 EP A273 4377881 EP A274 4377881 EP A275 4377881 EP A276 4377881 EP A277 4377881 EP A278 4377881 EP A279 4377881 EP A280 4377881 EP A281 4377881 EP A282 4377881 EP A283 4377881 EP A284 4377881 EP A285 4377881 EP A286 4377881 EP A287 4377881 EP A288 4377881 EP A289 4377881 EP A290 4377881 EP A291 4377881 EP A292 4377881 EP A293 4377881 EP A294 4377881 EP A295 4377881 EP A296 4377881 EP A297 4377881 EP A298 4377881 EP A299 4377881 EP A300 4377881 EP A301 4377881 EP A302 4377881 EP A303 4377881 EP A304 4377881 EP A305 4377881 EP A306 4377881 EP A307 4377881 EP A308 4377881 EP A309 4377881 EP A310 4377881 EP A311 4377881 EP A312 4377881 EP A313 4377881 EP A314 4377881 EP A315 4377881 EP A316 4377881 EP A317 4377881 EP A318 4377881 EP A319 4377881 EP A320 4377881 EP A321 4377881 EP A322 4377881 EP A323 4377881 EP A324 4377881 EP A325 4377881 EP A326 4377881 EP A327 4377881 EP A328 4377881 EP A329 4377881 EP A330 4377881 EP A331 4377881 EP A332 4377881 EP A333 4377881 EP A334 4377881 EP A335 4377881 EP A336 4377881 EP A337 4377881 EP A338 4377881 EP A339 4377881 EP A340 4377881 EP A341 4377881 EP A342 4377881 EP A343 4377881 EP A344 4377881 EP A345 4377881 EP A346 4377881 EP A347 4377881 EP A348 4377881 EP A349 4377881 EP A350 4377881 EP A351 4377881 EP A352 4377881 EP A353 4377881 EP A354 4377881 EP A355 4377881 EP A356 4377881 EP A357 4377881 EP A358 4377881 EP A359 4377881 EP A360 4377881 EP A361 4377881 EP A362 4377881 EP A363 4377881 EP A364 4377881 EP A365 4377881 EP A366 4377881 EP A367 4377881 EP A368 4377881 EP A369 4377881 EP A370 4377881 EP A371 4377881 EP A372 4377881 EP A373 4377881 EP A374 4377881 EP A375 4377881 EP A376 4377881 EP A377 4377881 EP A378 4377881 EP A379 4377881 EP A380 4377881 EP A381 4377881 EP A382 4377881 EP A383 4377881 EP A384 4377881 EP A385 4377881 EP A386 4377881 EP A387 4377881 EP A388 4377881 EP A389 4377881 EP A390 4377881 EP A391 4377881 EP A392 4377881 EP A393 4377881 EP A394 4377881 EP A395 4377881 EP A396 4377881 EP A397 4377881 EP A398 4377881 EP A399 4377881 EP A400 4377881 EP A401 4377881 EP A402 4377881 EP A403 4377881 EP A404 4377881 EP A405 4377881 EP A406 4377881 EP A407 4377881 EP A408 4377881 EP A409 4377881 EP A410 4377881 EP A411 4377881 EP A412 4377881 EP A413 4377881 EP A414 4377881 EP A415 4377881 EP A416 4377881 EP A417 4377881 EP A418 4377881 EP A419 4377881 EP A420 4377881 EP A421 4377881 EP A422 4377881 EP A423 4377881 EP A424 4377881 EP A425 4377881 EP A426 4377881 EP A427 4377881 EP A428 4377881 EP A429 4377881 EP A430 4377881 EP A431 4377881 EP A432 4377881 EP A433 4377881 EP A434 4377881 EP A435 4377881 EP A436 4377881 EP A437 4377881 EP A438 4377881 EP A439 4377881 EP A440 4377881 EP A441 4377881 EP A442 4377881 EP A443 4377881 EP A444 4377881 EP A445 4377881 EP A446 4377881 EP A447 4377881 EP A448 4377881 EP A449 4377881 EP A450 4377881 EP A451 4377881 EP A452 4377881 EP A453 4377881 EP A454 4377881 EP A455 4377881 EP A456 4377881 EP A457 4377881 EP A458 4377881 EP A459 4377881 EP A460 4377881 EP A461 4377881 EP A462 4377881 EP A463 4377881 EP A464 4377881 EP A465 4377881 EP A466 4377881 EP A467 4377881 EP A468 4377881 EP A469 4377881 EP A470 4377881 EP A471 4377881 EP A472 4377881 EP A473 4377881 EP A474 4377881 EP A475 4377881 EP A476 4377881 EP A477 4377881 EP A478 4377881 EP A479 4377881 EP A480 4377881 EP A481 4377881 EP A482 4377881 EP A483 4377881 EP A484 4377881 EP A485 4377881 EP A486 4377881 EP A487 4377881 EP A488 4377881 EP A489 4377881 EP A490 4377881 EP A491 4377881 EP A492 4377881 EP A493 4377881 EP A494 4377881 EP A495 4377881 EP A496 4377881 EP A497 4377881 EP A498 4377881 EP A499 4377881 EP A500 4377881 EP A501 4377881 EP A502 4377881 EP A503 4377881 EP A504 4377881 EP A505 4377881 EP A506 4377881 EP A507 4377881 EP A508 4377881 EP A509 4377881 EP A510 4377881 EP A511 4377881 EP A512 4377881 EP A513 4377881 EP A514 4377881 EP A515 4377881 EP A516 4377881 EP A517 4377881 EP A518 4377881 EP A519 4377881 EP A520 4377881 EP A521 4377881 EP A522 4377881 EP A523 4377881 EP A524 4377881 EP A525 4377881 EP A526 4377881 EP A527 4377881 EP A528 4377881 EP A529 4377881 EP A530 4377881 EP A531 4377881 EP A532 4377881 EP A533 4377881 EP A534 4377881 EP A535 4377881 EP A536 4377881 EP A537 4377881 EP A538 4377881 EP A539 4377881 EP A540 4377881 EP A541 4377881 EP A542 4377881 EP A543 4377881 EP A544 4377881 EP A545 4377881 EP A546 4377881 EP A547 4377881 EP A548 4377881 EP A549 4377881 EP A550 4377881 EP A551 4377881 EP A552 4377881 EP A553 4377881 EP A554 4377881 EP A555 4377881 EP A556 4377881 EP A557 4377881 EP A558 4377881 EP A559 4377881 EP A560 4377881 EP A561 4377881 EP A562 4377881 EP A563 4377881 EP A564 4377881 EP A565 4377881 EP A566 4377881 EP A567 4377881 EP A568 4377881 EP A569 4377881 EP A570 4377881 EP A571 4377881 EP A572 4377881 EP A573 4377881 EP A574 4377881 EP A575 4377881 EP A576 4377881 EP A577 4377881 EP A578 4377881 EP A579 4377881 EP A580 4377881 EP A581 4377881 EP A582 4377881 EP A583 4377881 EP A584 4377881 EP A585 4377881 EP A586 4377881 EP A587 4377881 EP A588 4377881 EP A589 4377881 EP A590 4377881 EP A591 4377881 EP A592 4377881 EP A593 4377881 EP A594 4377881 EP A595 4377881 EP A596 4377881 EP A597 4377881 EP A598 4377881 EP A599 4377881 EP A600 4377881 EP A601 4377881 EP A602 4377881 EP A603 4377881 EP A604 4377881 EP A605 4377881 EP A606 4377881 EP A607 4377881 EP A608 4377881 EP A609 4377881 EP A610 4377881 EP A611 4377881 EP A612 4377881 EP A613 4377881 EP A614 4377881 EP A615 4377881 EP A616 4377881 EP A617 4377881 EP A618 4377881 EP A619 4377881 EP A620 4377881 EP A621 4377881 EP A622 4377881 EP A623 4377881 EP A624 4377881 EP A625 4377881 EP A626 4377881 EP A627 4377881 EP A628 4377881 EP A629 4377881 EP A630 4377881 EP A631 4377881 EP A632 4377881 EP A633 4377881 EP A634 4377881 EP A635 4377881 EP A636 4377881 EP A637 4377881 EP A638 4377881 EP A639 4377881 EP A640 4377881 EP A641 4377881 EP A642 4377881 EP A643 4377881 EP A644 4377881 EP A645 4377881 EP A646 4377881 EP A647 4377881 EP A648 4377881 EP A649 4377881 EP A650 437788	

US	A	4361587	30-11-82
US	A	4980450	25-12-90
US	A	5219735	15-06-93
US	A	5452476	04-10-94
ZA	A	8100590	24-02-82

---